

前体及真菌诱导子对银杏悬浮培养细胞产生银杏内酯 B 的影响

戴均贵, 朱蔚华*, 吴蕴祺, 胡秋, 张大勇

(中国医学科学院, 中国协和医科大学药物研究所, 北京 100050)

摘要 目的:探索前体及真菌诱导子对银杏悬浮培养细胞产生银杏内酯 B 的影响。方法:通过向培养基中补加前体及真菌诱导子,考察它们对悬浮培养细胞生物量及银杏内酯 B 产量的影响。结果:于培养基中添加 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 异戊二烯及低浓度($10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的牻牛儿醇能提高 GKB 的产量,分别比对照增加了 69%, 13.8% 和 11.4%。从 10 种真菌诱导子中筛选出效果较好的日本根霉诱导子,当添加浓度为 $5 \text{ mg GE} \cdot \text{L}^{-1}$, 诱导培养 3 d 时,悬浮细胞的 GKB 产量比对照增加约 1 倍。结论:在银杏悬浮细胞培养过程中,添加前体物质及应用真菌诱导子是提高银杏内酯 B 的有效手段之一。

关键词 前体;诱导子;悬浮细胞培养;银杏内酯 B;银杏

银杏(*Ginkgo biloba* L.)所含的萜内酯主要有银杏内酯(Ginkgolides, GKs) A, B, C, J, M 和白果内酯(Bilobalide, BB),均为该种植物所特有。GK(尤其是 GKB)是天然的血小板活化因子受体特异拮抗剂,对治疗哮喘、内毒素休克、器官移植排斥反应、心脑血管疾病及多种炎症均有较好的效果。迄今,银杏萜内酯来源于银杏叶,人们试图通过其他途径生产银杏萜内酯,如化学合成、植物组织与细胞培养技术。通过组织与细胞培养技术生产银杏内酯是一条较为有效的途径。

在植物细胞培养中,向培养基中加入目的化合物生物合成的前体及应用真菌诱导子是提高有用次生代谢产物产量的有效途径。目前在银杏细胞培养的研究中,尚未见与此有关的报道。本文试验了几种前体及 10 种真菌种诱导子对银杏悬浮细胞合成银杏内酯的影响。

材料与方 法

试验材料及培养方法

试验材料为培养约 10 代次的 GS-I 悬浮细胞系,接种前将足够量的种子细胞混合,静置数分钟,弃去上层培养液,用筛状接种勺捞出一定量的细胞培养物,滤干培养物后接入 500 mL 三角瓶中培养。

每瓶盛装培养基 120 mL,接种量为干细胞 $\cdot \text{L}^{-1}$ 5.0 g ,培养基为 MS + NAA($0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) + 6-BA($0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) + 2,4-D($0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),黑暗摇床振荡培养,摇床转速为 $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,培养温度为 $(23 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$ 。

前体试验

不同浓度的牻牛儿醇(geraniol, Sigma) 异戊二烯(isoprene, Fluka)于接种时通过过滤灭菌加入。

真菌诱导子试验

1 诱导子的制备 真菌培养基为改良 PDA 培养基,组成成分:马铃薯($200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$),葡萄糖($20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), K_2HPO_4 ($1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$),琼脂($15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)。用接种针将畸雌腐霉(*Pythium irregulare*)、冠毛犁头霉(*Absidia cristata*)、日本根霉(*Rhizopus japonicus*)、轮枝孢霉(*Verticillium dahliae*)、小刺青霉(*Penicillium spinulosum*)、腐皮镰孢霉(*Fusarium solani*)、米曲霉(*Aspergillus oryzae*)、桔青霉(*Penicillium citrinum*)、鲁氏毛霉(*Mucor rouxianus*)等 9 种真菌接种在上述培养基上,于 $(23 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$ 下黑暗培养 3 d 后,挑取菌丝接种在上述去掉琼脂的液体培养基中,在黑暗中摇床培养($120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 7 d 后抽滤收取菌丝,用蒸馏水清洗 3 次。清洗后的菌丝加等体积的蒸馏水匀浆,抽滤得菌丝提取液, $121 \text{ }^\circ\text{C}$ 消毒 25 min 即得;酵母诱导子的制备是将酵母提取物用蒸馏水溶解消毒后即得。

2 诱导子的加入 诱导子的加入量按菌液或溶液中含糖量计算,单位为 $\text{mg GE} \cdot \text{L}^{-1}$ (glucose

收稿日期: 1999-07-07

* 联系人 Tel: (010) 63165195, Fax: (010) 63017757,

E-mail: whzhu@imm.ac.cn

equivalent,葡萄糖当量),糖含量的测定按硫酸-酚法^[1]。不同诱导子试验时,诱导子均于细胞悬浮培养到第 18 d 时按不同浓度加入;诱导子诱导时间试验从 0 d 开始,每隔 3 d 按 5.0 mg GE·L⁻¹ 的浓度向培养基中加入日本根霉菌丝提取液。

取样

除在进行悬浮细胞培养的动态变化研究中每 3 d 取样 1 次外,其他试验均于细胞培养到第 21 d 时收取。

数据处理

1 细胞生物量计算 细胞生物量 (gDW g·L⁻¹) = 每瓶收获细胞干重(g) × 1000/120。

2 培养物中 GKB 含量的测定 经滤纸滤得的细胞培养物于 50 °C 下烘干至恒重,余下处理及测定方法按文献^[2]进行。

3 培养基中 GKB 的提取及测定 收获时用滤纸滤去培养物,得到无细胞的培养液,用等量乙酸乙酯萃取,减压蒸干后用适量甲醇定容,按文献^[2]进行 GKB 含量的测定。

4 GKB 产量的计算 GKB 产量 (mg·L⁻¹) = 细胞培养物中 GKB 产量 (mg·L⁻¹) + 细胞培养液中 GKB 产量 (mg·L⁻¹)。

所有试验均为 3 个重复。

结 果

1 银杏细胞系 GS-I 悬浮培养的动力学研究

对银杏细胞悬浮体系 GS-I 进行了生长、GKB 积累的动力学研究,结果(图 1)表明,悬浮细胞系 GS-I 的生长没有经历延迟期且速度较快,整个周期经历了 4 个主要阶段,即 1) 快速生长期(0 ~ 3 d): 细胞生长较快,生物量约增加了 1 倍;2) 缓慢生长期(3 ~ 9 d): 细胞生长较为缓慢,生物量增加较少;3) 指数生长期(9 ~ 18 d): 细胞生长速度比前一时期明显加快,生物量显著增加,在 18 d 时达到了最高生物量(21.6 g·L⁻¹),约为起始接种的 4.5 倍;4) 静止期(18 ~ 21 d): 细胞在这一时期呈负增长,生物量略有下降。细胞中 GKB 的产量在整个生长周期的变化趋势与细胞生长趋势一致,也分为 3 个时期;而培养液中的 GKB 产量呈缓慢增加趋势,总产量的变化趋势与其生长及细胞中 GKB 产量的变化趋势一致,于第 21 d 达到最高,约为 11 mg·L⁻¹,据此在以后的试验中均于培养第 21 d 收获。

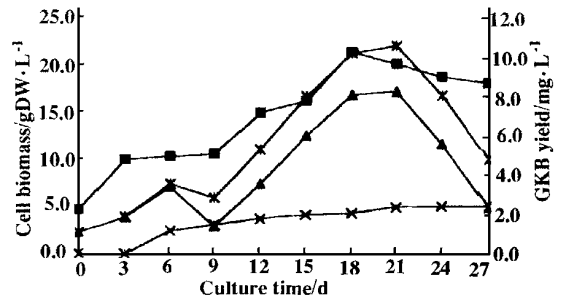


Fig 1 Kinetics of the cell growth, GKB contents in GS-I cell suspension culture of *Ginkgo biloba*. ■—■ Biomass/g DW·L⁻¹; ▲—▲ GKB yield in cells/ mg·L⁻¹; ×—× GKB yield in medium/ mg·L⁻¹; *—* Total GKB yield/ mg·L⁻¹.

2 前体异戊二烯、β-牛儿醇对银杏悬浮细胞系 GS-I 生长及 GKB 形成的影响

银杏内酯是萜类化合物,而异戊二烯、β-牛儿醇是萜类物质生物合成的前体,在培养基中分别添加不同浓度的上述前体对银杏悬浮细胞系 GS-I 生长及 GKB 积累的影响结果(表 1)表明,1) 在培养基中添加 100 mg·L⁻¹ 的异戊二烯,对细胞的生长及 GKB 的积累均有较好的促进作用,生物量比对照增加 44%,总产量为对照的 1.69 倍。2) 高浓度(500 mg·L⁻¹)的β-牛儿醇对细胞的生长有着很强的抑制作用,其生物量仅为对照的 53%;而低浓度(10, 50 mg·L⁻¹)β-牛儿醇对细胞培养物中 GKB 的积累和 GKB 总产量有一定的促进作用。

3 真菌诱导子对银杏悬浮细胞系 GS-I 生长及 GKB 形成的影响

3.1 不同真菌诱导子对银杏悬浮细胞系 GS-I 生长及 GKB 形成的影响

在细胞培养至第 18 d 时,以不同浓度加入不同真菌诱导子,结果(表 2)表明,10 种诱导子的效果不同。不同浓度的真菌诱导子对细胞的生长没有产生明显的影响,但对细胞中 GKB 的积累均有不同程度的抑制作用,并且促进 GKB 向培养基中分泌。其中日本根霉(*R. hizopus japonicu*)的作用最明显,当加入浓度为 5.0 mg GE·L⁻¹ 时细胞中 GKB 的含量最高,但当浓度为 20.0 mg GE·L⁻¹ 时,培养液中 GKB 的分泌量最高,从 GKB 总产量看,则在浓度为 5.0 mg GE·L⁻¹ 时为最高,同时所有处理中 GKB 产量也是最高的,因而采用 5.0 mg GE·L⁻¹ 日本根霉提取液作为诱导子作进一步的试验研究。

Tab 1 Effects of isoprene and geraniol on the growth and GKB formation in GS I cell suspension culture of *Ginkgo biloba*

Precursors	Concentration / mg·L ⁻¹	Harvest dry cells / mg·L ⁻¹	GKB yield in cells / mg·L ⁻¹	GKB yield in medium / mg·L ⁻¹	Total GKB yield / mg·L ⁻¹
Isoprene	0(CK)	16.3 ± 1.36	2.58 ± 0.72	9.72 ± 0.75	12.30 ± 3.08
	10	16.4 ± 0.89	4.60 ± 1.04 [*]	12.46 ± 2.01	17.06 ± 6.61 [*]
	50	18.5 ± 4.76	4.70 ± 0.83 [*]	12.66 ± 3.19	17.36 ± 1.03 [*]
	100	23.5 ± 2.57 [*]	10.1 ± 3.21 ^{**}	10.56 ± 3.97	20.8 ± 4.8 [*]
	200	15.6 ± 1.66	3.76 ± 0.74	11.77 ± 3.95	15.36 ± 3.38 [*]
	500	15.2 ± 1.14	4.93 ± 1.02 [*]	9.73 ± 1.72	14.66 ± 2.65
Geraniol	10	17.1 ± 0.99	5.30 ± 1.33 [*]	10.73 ± 1.59	16.03 ± 0.40 [*]
	50	17.1 ± 1.25	4.03 ± 0.29 [*]	9.93 ± 2.83	14.0 ± 3.09
	100	19.1 ± 4.32	2.51 ± 0.14	10.55 ± 3.41	12.99 ± 3.41
	200	15.7 ± 0.53	1.48 ± 0.28 [*]	11.76 ± 3.73	13.23 ± 3.87
	500	8.7 ± 0.72	0.67 ± 0.12 [*]	10.35 ± 2.34	11.02 ± 2.46

Notes : Basal medium was MS + NAA 0.5 mg·L⁻¹ + 6-BA 0.5 mg·L⁻¹ + 2,4-D 0.2 mg·L⁻¹ ; DW = dry weight ; Data = $\bar{x} \pm s$; n = 3 ; t-test , vs control : * P < 0.05 , ** P < 0.01 .

Tab 2 Effects of 10 fungi elicitors on the growth and GKB formation in GS I cell suspension culture of *Ginkgo biloba*

Fungi	Concentration / mg GE·L ⁻¹	Harvest dry cells / mg·L ⁻¹	GKB yield in cells / mg·L ⁻¹	GKB yield in media / mg·L ⁻¹	Total GKB yield / mg·L ⁻¹
CK	0	17.1 ± 1.33	15.03 ± 2.05	2.46 ± 0.30	17.49 ± 2.12
Yeast extract	5	15.1 ± 2.14	2.31 ± 0.45 ^{**}	3.57 ± 0.42 [*]	5.88 ± 0.68 ^{**}
	20	15.7 ± 1.54	10.28 ± 1.83	3.77 ± 1.54 [*]	14.05 ± 3.05
	50	15.3 ± 1.82	7.30 ± 1.23 [*]	8.18 ± 2.23 [*]	15.48 ± 2.90
<i>Pythium irregulare</i>	5	18.0 ± 1.23	9.12 ± 1.14 [*]	1.60 ± 1.46	10.72 ± 1.79 [*]
	20	16.7 ± 1.45	11.15 ± 2.14	5.55 ± 2.15 [*]	17.70 ± 3.12
	50	17.1 ± 2.01	10.76 ± 1.31	9.16 ± 2.33 [*]	19.92 ± 2.54
<i>Absidia cristata</i>	5	17.7 ± 1.30	6.65 ± 0.68 [*]	1.92 ± 0.21 [*]	8.57 ± 0.85 ^{**}
	20	16.7 ± 2.01	13.30 ± 1.42	3.86 ± 0.63 [*]	17.16 ± 2.01
	50	16.7 ± 1.56	11.06 ± 0.98	3.71 ± 0.45	14.78 ± 1.58
<i>Rhizopus japonicus</i>	5	15.7 ± 1.32	11.73 ± 0.87	20.56 ± 3.56 ^{**}	32.29 ± 5.12 ^{**}
	20	17.7 ± 1.25	5.72 ± 0.54 ^{**}	26.28 ± 4.12 ^{**}	32.0 ± 4.56 ^{**}
	50	15.4 ± 2.03	6.90 ± 1.23 [*]	7.25 ± 1.98 ^{**}	14.15 ± 2.35
<i>Verticillium dahliae</i>	5	16.5 ± 1.58	7.29 ± 0.85 [*]	6.46 ± 0.45 [*]	13.75 ± 1.24
	20	17.1 ± 1.67	9.16 ± 1.16 [*]	9.16 ± 2.45 ^{**}	18.32 ± 3.45
	50	16.4 ± 2.25	9.35 ± 1.54 [*]	14.47 ± 2.56 ^{**}	23.82 ± 5.21 [*]
<i>Penicillium spinulosum</i>	5	16.6 ± 2.26	9.68 ± 0.84 [*]	6.53 ± 0.51 [*]	16.21 ± 2.15
	20	15.8 ± 2.54	2.97 ± 0.36 ^{**}	12.43 ± 2.62 ^{**}	15.4 ± 3.31
	50	15.2 ± 1.08	10.18 ± 1.28	14.24 ± 3.12 ^{**}	24.42 ± 5.45 [*]
<i>Fasarium solani</i>	5	16.7 ± 0.97	3.96 ± 0.62 ^{**}	0.22 ± 0.04 [*]	4.16 ± 0.51 [*]
	20	15.9 ± 3.05	7.91 ± 1.11 [*]	2.25 ± 0.15	10.16 ± 1.02 [*]
	50	16.1 ± 1.51	9.91 ± 1.47 [*]	1.58 ± 0.24	11.49 ± 1.42 [*]
<i>Aspergillus oryzae</i>	5	17.4 ± 1.36	4.59 ± 0.65 [*]	3.88 ± 0.35 [*]	8.47 ± 1.21 ^{**}
	20	14.0 ± 3.12	6.79 ± 0.79 [*]	9.22 ± 0.78 ^{**}	16.01 ± 2.44
	50	19.4 ± 1.51	6.13 ± 0.95 [*]	7.11 ± 0.85 [*]	13.24 ± 1.58
<i>Penicillium citrinum</i>	5	15.8 ± 2.31	10.24 ± 1.18	15.49 ± 2.27 ^{**}	25.73 ± 3.56 [*]
	20	16.6 ± 1.05	9.78 ± 1.10	16.97 ± 2.58 ^{**}	26.75 ± 3.15 [*]
	50	18.0 ± 2.13	3.89 ± 0.41 ^{**}	13.68 ± 2.23 ^{**}	17.57 ± 2.12
<i>Mucor rouxianus</i>	5	18.0 ± 1.12	10.14 ± 1.05	0.62 ± 0.08 [*]	10.76 ± 1.25 [*]
	20	18.2 ± 0.96	5.97 ± 0.64 [*]	2.47 ± 0.60	8.44 ± 1.22 ^{**}
	50	16.8 ± 1.15	10.86 ± 0.89	5.49 ± 0.48 [*]	16.35 ± 2.13

Notes : Basal medium was MS + NAA 0.5 mg·L⁻¹ + 6-BA 0.5 mg·L⁻¹ + 2,4-D 0.2 mg·L⁻¹ ; DW = dry weight ; Data = $\bar{x} \pm s$; n = 3 ; t-test , vs control : * P < 0.05 , ** P < 0.01 .

3.2 不同诱导时间对银杏悬浮细胞系 GS-I 生长及 GKB 形成的影响

以日本根霉提取液 $5.0 \text{ mg GE} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为诱导子每隔 3 d 一次加入培养基中,考察对细胞系 GS-I 生长及 GKB 形成的影响,结果(表 3)表明,诱导子

在早期(0~6 d)加入时不利于 GS-I 细胞培养物的生长和 GKB 的产生,在 9 d 后加入时,对细胞生长的影响不明显,但细胞中 GKB 的含量有所提高,向培养液中分泌量也增加,在 18 d 时加入,不论是细胞中的含量还是培养液中的含量都达到最高。

Tab 3 Effects of inducing time of the elicitor on the growth and GKB formation in GS-I cell suspension culture of *Ginkgo biloba*

Inducing time / days	Harvest dry cells / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	GKB yield in cells / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	GKB yield in medium / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	Total GKB yield / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
21	15.3 ± 1.54	2.19 ± 0.25	$0.36 \pm 0.01^*$	2.55 ± 0.25
18	$12.7 \pm 0.46^*$	$1.40 \pm 0.24^*$	$0.51 \pm 0.02^*$	1.91 ± 0.21
15	15.6 ± 0.21	$0.57 \pm 0.10^{**}$	1.45 ± 0.05	2.02 ± 0.32
12	16.2 ± 0.17	2.59 ± 0.03	1.52 ± 0.04	4.11 ± 0.45
9	16.7 ± 0.79	3.63 ± 0.40	1.42 ± 0.14	5.05 ± 0.51
6	16.6 ± 0.09	3.58 ± 0.22	1.54 ± 0.21	5.12 ± 0.32
3	17.6 ± 0.38	$5.46 \pm 0.21^{**}$	$2.12 \pm 0.32^*$	$7.58 \pm 0.56^*$
0(CK)	18.7 ± 0.46	3.02 ± 0.41	1.25 ± 0.12	4.27 ± 0.36

Notes: Basal medium was MS + NAA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 6-BA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 2,4-D $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; DW = dry weight; Data = $\bar{x} \pm s$; n = 3; t-test, vs control: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

讨 论

在进行代谢调控时,将特定的次生代谢产物前体对细胞进行饲喂培养,能刺激产物的生物合成进而提高次生代谢产物的含量和产量。陈永勤等^[3]在进行杂种红豆杉(*Taxus media*)细胞培养研究的过程中添加紫杉烷类生物合成前体物质之一——苯丙氨酸,在一定程度上促进了细胞合成紫杉烷类物质的能力。本试验采用了几种前体物质进行饲喂试验,结果发现其作用与它们的种类和加入量有关: $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的异戊二烯不仅能促进银杏细胞的生长,还可提高 GKB 的产量; $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的柯牛儿醇能提高 GKB 的产量。

诱导子对次生代谢的调节是在酶和基因的水平上进行的。其特定的诱导信号被植物细胞识别,接受,通过细胞内吞或多种第二信使方式在胞内传递,提高代谢途径中有关酶的活性或增加酶量,从而影响次生产物的产量^[4]。诱导处理刺激培养细胞合成次生产物的作用受诱导子种类和浓度等许多因素的影响,不同种类的诱导子所具有的诱导信息类型、速度和强度也不同,本试验的结果也证明了这一点,10 种诱导子对银杏细胞形成 GKB 的效果不同,不同浓度的效果也不一样。诱导子的诱导作用依赖于培养细胞的生理状态,只有处于一定生长时期的细胞才能有效地接受诱导信号,此时诱导子表现为最

高活性。同一诱导子对不同细胞系的效果不一致,不同时期的细胞其生理状况不同,对诱导子的反应也不同,许多研究^[5,6]表明,诱导子在细胞指数生长期末、静止期初期加入时对次生代谢物合成的诱导效果最为明显。本试验也证明诱导子在不同时期加入,对细胞生长及 GKB 的产生有着不同的效应,对细胞系 GS-I 来说,诱导子在细胞培养到细胞指数生长末、静止期初期即第 18 d 时加入,诱导培养 3 d,可使细胞 GKB 的产量最高。

与其他大部分植物细胞培养相似,目前利用组织与细胞培养技术生产银杏内酯存在的主要问题仍然是:1) 缺乏高产稳定的细胞系,银杏内酯的产率低,达不到商业化生产的要求;2) 银杏内酯的生物合成途径及其关键步骤的关键酶还没有完全弄清,不能对其生物合成途径进行有目的、有针对性地调控;3) 在放大培养过程中,细胞生长缓慢,银杏内酯产量下降(结果将另文发表)。因此,这几个方面应是今后努力的方向。

参 考 文 献

- 1 袁晓华,杨中汉,编.植物生理生化实验.北京:高等教育出版社,1983.9~11
- 2 戴均贵,朱蔚华,吴蕴祺,等.不同培养基、激素、碳源和氮源对银杏愈伤组织生长及银杏内酯 B 形成的影响.中草药,1998,29(增刊): 63

- 3 陈永勤,吴蕴祺,胡秋,等.苯丙氨酸、蔗糖和甘露醇对杂种红豆杉的细胞生长及形成紫杉醇、巴卡亭 III 和 10-乙酰巴卡亭 III 的影响.药理学报,1998,33:132
- 4 Eilert U. Elicitation: methodology and aspects of application. In: Constabel F, Vassil IK, eds. *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, New York: Academic Press, 1987.153 ~ 196
- 5 宁文,曹日强.真菌诱导物对植物次生代谢的生长.植物生理学通讯,1993,29:321
- 6 张荫麟,朱敏,赵保华.蜜环菌诱导子对延胡索培养物生物碱积累的影响.植物学报,1993,34:658
- 7 刘长军,侯嵩生.真菌诱导子对新疆紫草悬浮培养细胞的生长和紫草素合成的影响.植物生理学报,1998,24:6

EFFECTS OF PRECURSORS AND FUNGAL ELICITORS ON GKB PRODUCTION IN SUSPENSION CULTURED CELLS OF *GINKGO BILOBA* L.

Dai Jungui, Zhu Weihua, Wu Yunqi, Hu Qiu and Zhang Dayong

(*Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and
Peking Union Medical College, Beijing 100050*)

ABSTRACT **AIM:** To investigate the effects of precursors and fungal elicitors on the GKB production in suspension cultured cells of *Ginkgo biloba* L. **METHODS:** Precursors and fungal elicitors were added to the media. Their effects on the biomass and GKB yields of the suspension of cultured cells were studied. **RESULTS:** The total GKB yields were enhanced 69%, 13.8% and 11.4% compared with the control by adding 100 mg·L⁻¹ of isoprene and low concentrations (10 and 50 mg·L⁻¹) of geraniol in the medium, respectively. Of the 10 investigated fungal elicitors, mycelium extract of *Rhizopus japonicus* was found to be the best, and at the concentration of 5 mg GE·L⁻¹, the GKB yield of suspension cells was doubled after the cells were induced for 3 days. **CONCLUSION:** Adding precursors in the media and applying fungal elicitors were both effective approaches to enhance GKB yields in the suspension culture cell of *Ginkgo biloba* L.

KEY WORDS precursors; fungal elicitors; suspension cell culture; ginkgolide B (GKB); *Ginkgo biloba* L.